

89

Beispiel 4: Herstellung von mit Digoxigenin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP-DIG) als Komponente 3

5 In Analogie zu Beispielen 1.1. und 1.2. wurde Meerrettich-Peroxidase (Sigma) dialysiert und mit DIG haptenisiert, wobei die selben Proteinkonzentrationen, Lösungen, Reagenzien und Bedingungen verwendet wurden.

Beispiel 5.: Herstellung von cytotoxischen T Zellen (Effektorzellen)

10

Humane mononukleare Blutzellen (PBMC) wurden über Ficoll Dichtezentrifugation wie üblich isoliert. PBMC wurden resuspendiert in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in DMEM, 4.5 g Glukose/l (Gibco, Deutschland), enthaltend 5×10^{-5} mol/l 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deutschland), 10 mmol/l Natriumpyruvat (Gibco, 15 Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg Streptomycin. Die Zellen wurden auf einer mit OKT3(CD3) (ATCC CRL8001), 10 µg/ml, vorbehandelten (precoated) Platte bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen geerntet und über "magnetic activated cell sorting" (MACS, Mini-Macs, Milteny, Deutschland) positiv (CD8, Milteny) angereichert.

20

Beispiel 6: Cytotoxischer Assay

Gemäß dem Verfahren nach BOHLEN, H. et al., J. Immun. Meth. 173(1):55 - 62, 25 1994, wurden über Elektroporation Europium-markierte EBV-immortalisierte B-Zellen hergestellt. Die EBV-immortalisierten B-Zellen wurden nach dem Verfahren von STUART, A. D. et al., Oncogene 11(9):1711-1719, 1995, gewonnen. Diese Zellen wurden als Zielzellen in Löcher einer 96-Loch Platte mit V-Boden gegeben (50 µl/Loch, 1×10^5 Zellen/ml). Effektorzellen (jeweils 1.0×10^5 Zellen/ml) gemäß 30 Beispiel 5 und Antikörperlösungen (anti-DIG:anti-DNP aus Beispiel 3, anti-CD3-DNP aus Beispiel 2 und anti-CD19-DIG, haptenisiert in Analogie zu Beispiel 1.1. und 1.2. (anti-CD19 wurde von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, bezogen)) wurden danach zu einem Endvolumen von 200 µl hinzugegeben. Maximale und spontane Freisetzung wurden durch Zusatz von entweder 150 µl komplettes 35 Medium oder durch Triton X-100 (0,5%) bestimmt. Die Platten wurden für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach der Inkubationszeit wurde die

Markerfreisetzung durch Hinzufügung von 20 µl Überstand zu 200 µl "enhancement" Lösung (Pharmacia, Freiburg) gemessen.

Die Fluoreszenz wurde dann in einem DELFIA Fluorometer (Wallac, Turku, Finnland) evaluiert durch Verwendung eines 613 nm Filters für die Bestimmung von Europium. Hintergrundfluoreszenz wurde aus drei Extra-Löchern erhalten, welche 5000 Zielzellen in 200 µl Komplettmedium enthielten. Die Cytotoxizität wurde berechnet gemäß

$$\frac{\{(Probe-Zählung - Zählung spontane Freisetzung) / (Zählung maximale Freisetzung - Zählung spontane Freisetzung)\} \times 100}{\% \text{ spezifische Lyse.}}$$

Um Artefakte zu vermeiden, welche durch zufällige Europium Kontaminationen herrühren könnten, wurden alle Reagenzien vor dem Assay daraufhin überprüft.

Beispiel 7: Verwendung der anti-DNP:anti-DIG bispezifischen Antikörper in einem Enzym-gekoppelten Immunosorbenttest (ELISA)

Das Prinzip des ELISA ist die spezifische Antigenbestimmung mit Antikörpern. In diesem Beispiel wird der Test zum Nachweis von Immunglobulin G4 (Human) verwendet. Der Aufbau dieses Testsystems beruht auf dem Sandwichprinzip. An eine Plastikoberfläche werden sogenannte Fangantikörper gekoppelt, welche den zu testenden Antikörper erkennen. Anschließend wird der zu testende Überstand zugegeben. In einem weiteren Schritt kommt ein zweiter, Hapten (DNP)-gekoppelter Antikörper hinzu, der wiederum spezifisch an den Testantikörper bindet. Im nächsten Schritt wird der bispezifische anti-DNP:anti-DIG Antikörper zugegeben und dann gewaschen. Im weiteren wird Hapten (DIG) markiertes Enzym hinzugegeben und nach Inkubation und Waschen durch Substrat visualisiert bzw. detektiert. Die Markierung des Detektionsantikörpers mit dem Enzym kann auch vor dem ELISA durch die equimolare Mischung von Hapten-markierten Detektionsantikörper mit anti-DNP:anti-DIG bispezifischen Antikörpern sowie Hapten (DIG)-markiertem Enzym durchgeführt werden.

Für den Assay wurden folgende Materialien verwendet:

- 96 Lochplatten (Immuno Maxisorp F96, Nunc GmbH, Deutschland)
- Phosphat-gepufferte Saline (PBS; Gibco BRL)
- PBS mit 1 % Rinder Serum Albumin (BSA; Sigma)
- Substratpuffer der Zusammensetzung:

9/

10 ml 55 mM Citronensäure (Merck, Darmstadt), pH 4,0

100 µl ABTS (2,2'-Azino-bis[3-Ethylbenzthiazolin]-6-sulfonsäure)

(Boehringer Mannheim); Stammlösung: 15 mg/ml

3,3 µl H₂O₂ (33%ig) (Merck, Darmstadt)

- 5 • ELISA-Reader: Titertek Multiscan® Plus MK II (405 nm) (Flow Laboratories)

Als Reagenzien wurden benutzt:

Reagenz Nr	Reagenz	konjugiert mit
1	Human IgG ₄	unkonjugiert
2 (Komponente 1)	Ziege anti human total-DNP	DNP und HRP* (1:2000)**
3 (Komponente 2)	anti-DNP:anti-DIG bispezifischer Antikörper	-
4 (Komponente 3)	HRP*	DIG (1:5000)**

* HRP = Meerrettich-Peroxidase, ** Werte in Klammern geben die eingesetzt n
10 Verdünnungen an

Der unkonjugierte Antikörper Human IgG₄ (Reagenz 1) (LD Labordiagnostika, Heiden, Deutschland) wurde auf der 96 Lochplatte durch Bindung an das Plastik mit einer Konzentration von 5 µg Antikörper /ml PBS und 50 µl/Loch bei 4°C über
15 Nacht immobilisiert. Die freien Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden durch 100 µl PBS mit 1% BSA/Loch bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und Raumtemperatur (RT) abgesättigt, um eine unspezifische Bindung weiterer Reagenzien zu verhindern. Die zu testende Lösung (Reagenz 2) wurde in
20 verschiedenen Verdünnungsreihen (1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05 und 0.01 mg/ml in PBS/1%BSA) und den entsprechenden positiven und negativen Kontrollen auf die Platte pipettiert. Das Volumen betrug 50 µl/Loch und die Inkubationszeit 30 Minuten bei RT. Anschließend wurde 3 mal mit 250 µl PBS/Loch gewaschen. Danach wurde der bispezifische anti-DNP:anti-DIG Antikörper (Reagenz 3, bzw. Komponente 2) in einer Verdünnung von 0.1 µg/ml zugefügt und für eine Stunde
25 bei RT inkubiert. Nach dreimaligen Waschen wurden 100 µl DIG-konjugierte HRP (Reagenz 4 bzw. Komponente 3) zugefügt. Substratpuffer (200 µl/Loch) wurden nach 1 Stunde Inkubation und dreimaligem Waschen zugegeben und für mindestens 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, daß der OD-Wert von ca. 1.0 wurde hierbei nicht überschritten wurde. Die

enzymatische Farbreaktion (ABTS) wurde im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Das Resultat, welches die Funktionsfähigkeit der erfindungsgemäßen Kombinationspräparation n anhand dieses Beispiels demonstriert, zeigt Figur 2.

5

Beispiel 8: Oberflächenfärbung von PBMC mit Fluorescein-Isothiocyanat

Für diesen Versuch wurden folgende Materialien verwendet:

- 10 • Antikörper oder Antikörper-Fragmente Fa(b) gegen die Oberflächenstruktur CD19 (anti-CD19) (Becton-Dickinson) mit DNP haptenisiert (als Komponente 1)
- anti-DNP:anti-DIG bispezifischer Antikörper (als Komponente 2),
- BSA haptenisiert mit DIG und konjugiert mit Fluorescein-Isothiocyanat (als Komponente 3)

15

- PBMC (1×10^6 pro Test) wurden nach bekannten Methoden über Fico[®] isoliert und mit dem DNP haptenisierten anti-CD19 Antikörper (5 µg/ml) inkubiert (15 Minuten, RT). Nach dem Waschen der Zellen (5,0 ml PBS) wurden die Zellen mit dem anti-DNP:anti-DIG bispezifischen Antikörper (1,0 µg/ml) bei RT für 15 Minuten
- 20 inkubiert und im weiteren mit dem DIG-haptenisierten BSA (5,0 µg/ml), welches nach bekannten Methoden mit Fluorescein-Isothiocyanat konjugiert war, für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Fluoreszenzaktivität wurde nach Waschen mit 5,0 ml PBS im Durchflußzytometer (auf 5×10^4 Zellen) bestimmt. Die Figur 3 zeigt das erhaltene Ergebnis und sie demonstriert zugleich, daß auch für detektierbare
- 25 Oberflächenmarkierungen die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen bestens geeignet sind.

Beispiel 9: Immunisierung mit Tumorproteinen durch Focussierung von Tumorantigenen an dendritische Zellen

- 5 Für diesen Versuch wurden folgende Reagenzien verwendet:
- Idiotyp (38 CB) (beschrieben in BERGMAN, Y. & HAIMOVICH J., Europ. J. Immunol. 7:413-417, 1977 und ESHAR, Z. et al., J. Immunol. 122:2430-2434, 1979) mit DNP haptenisiert (als Komponente 1),
 - anti-DNP:anti-DIG bispezifischer Antikörper (als Komponente 2)
 - 10 • anti-Klasse II Antikörper (ATCC, HB42) haptenisiert mit DIG (als Komponente 3)

Es wurden *in vitro* äquimolare Mengen der oben beschriebenen Komponenten 1, 2 und 3 miteinander für 1 Stunde bei RT in PBS inkubiert, wobei die Antikörperkonzentrationen 50 µg/ml betrugen. Im Anschluß daran wurden jeweils

15 10 (n=10) C₃H/He Mäuse (Charles River Wiga, München, Deutschland) mit den oben beschriebenen Komponenten 1, 2 und 3 (Test), und jeweils mit der Kontrolle 1 (Komponenten 1 plus Komponente 2) Kontrolle 2 (Komponente 2 plus Komponente 3), Kontrolle 3 (nur Komponente 1) Kontrolle 4 (nur Komponente 2) und Kontrolle 5 (nur Komponente 3) intraperitoneal immunisiert, wobei jeweils 50 µ

20 g pro Maus der jeweiligen Komponente (in 100 µl PBS) verwendet wurden. Im Anschluß daran wurde die Immunisierung durch Analyse des Überlebens und Tumorgröße durchgeführt. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, daß nach Immunisierung mit den Komponenten 1, 2 und 3 sowohl anti-idiotypische Antikörper als auch 40% langzeitüberlebende Mäuse notiert werden konnten. Die

25 nachfolgende Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 2: Tumormunität bei Mäusen (N = 10), induziert durch Tumorzellen (38 CB) mit anti-Klasse II Antikörpern durch Verwendung der oben beschriebenen Kombinationspräparation

5

Tage nach der i.p. Injektion der jeweiligen Komponenten						
	10	15	20	25	30	35
Überlebende (n = 10)						
Test	10	10	10	10	6	4
Kontrolle 1	10	10	8	2	0	0
Kontrolle 2	10	10	7	3	0	0
Kontrolle 3	10	10	8	4	0	0
Kontrolle 4	10	10	8	4	0	0
Kontrolle 5	10	10	7	2	0	0

Die erfindungsgemäßen Kombinationspräparationen eignen sich anhand dieses Beispiels hervorragend für die Immunisierung mit Tumorproteinen.

10

Beispiel 10: Formulierung einer Kombinationspräparation

Komponente 1: Anti-human-Cytomegalovirus Immediate Early Antigen (IEA) monoklonaler Antikörper, Maus IgG₁ (IEA E13, Argène

15

Biosoft Perc Technologique, Delta Sud BP24, Varilhes, Frankreich, Bestell Nummer: 11-003), haptenisiert mit DNP. 1 Fläschchen mit 0,5 ml Konjugat, Konzentration 250 µg/ml in PBS pH 7,2 mit 1% Rinder Serumalbumin (BSA), 50% Glycerin und 0,01% Thimerosal.

20

Komponente 2: Bispezifischer anti-DNP:anti-DIG Antikörper.

1 Fläschchen mit 0,5 ml des bispezifischen Antikörpers, Konzentration 350 µg/ml in PBS, pH 7,2, mit 1% BSA, 50% Glycerin und 0,01% Thimerosal.

Komponente 2: Meerrettich-Peroxidase (HRPO), haptenisiert mit DIG.

25

1 Fläschchen mit 0,5 ml Konjugat, Konzentration 140 µg/ml in PBS, pH 7,2, mit 1% BSA, 50% Glycerin und 0,01% Thimerosal.

In diesem Fall wurde zugrundegelegt, daß 50% der Komponente 1 mit einem Molekül DNP und 50% mit zwei Molekülen DNP konjugiert sind. Komponente 2 enthält daher ca. 30% mehr Antikörper als Komponente 1. Bei der Konzentration der Komponente 3 wurde berücksichtigt, daß 50% der Peroxidase mit einem Molekül DIG gekoppelt sind, 50% mit zwei Molekülen. Damit jede Bindungsstelle der Komponente 2 jeweils ein Molekül Peroxidase binden kann, wurde die Zahl der verfügbaren Peroxidasemoleküle der Komponente 3 um mehr als 30% erhöht im Vergleich zur Zahl der bispezifischen Antikörper (Komponente 2). Durch die Wahl der Konzentrationen kann der Anwender jede Komponente gleich verdünnen. Für immundiagnostische, insbesondere immunzytochemische, Anwendungen, werden die Antikörper 1:10 in PBS, pH 7,2, verdünnt. Je nach Art der Probe und des Verwendungszweckes kann eine andere Verdünnung gewählt werden.

96
Patentanspruch

1. Kombinationspräparationen bestehend aus mindestens einer mit einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_1 ausgestatteten ersten Komponente, einer mindestens bispezifischen zweiten Komponente mit Bindungsspezifität für Ha_1 (anti- Ha_1) und für mindestens eine weitere Bindungsspezifität für eine von Ha_1 verschiedene definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante Ha_2 (anti- Ha_2) oder mit weiteren Bindungsspezifitäten für mehrere solcher Determinanten Ha_n (anti- Ha_n), welche untereinander verschieden sind und einer dritten Komponente, welche mit mindestens einer definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinante Ha_2 oder mit mehreren solchen Determinanten Ha_n ausgestattet ist oder sind, wobei Ha_1 , Ha_2 und Ha_n untereinander verschieden sind.

2. Kombinationspräparationen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusammengesetzt sind aus

Komponente 1: (T):X— Ha_1

Komponente 2: anti- Ha_1 —Y—anti- Ha_2 bzw.

anti- Ha_1 —Y—anti- Ha_n

Komponente 3: Ha_2 —Z bzw. Ha_n —Z

worin

- X ein mit einer Determinante Ha_1 ausgestattetes bzw. verbundenes Reagenz ist, welches monospezifisch hinsichtlich seines Zielortes (T) sein kann, umfassend ein Protein, ein Immunglobulin bzw. ein Antikörper oder ein Derivat oder Fragment davon, ein Ligand, ein Lectin, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Chemokin, ein Lymphokin,
- Ha_1 eine definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop,
- Y ein mindestens für mindestens zwei Determinanten Ha_1 und Ha_2 bzw. Ha_n bispezifisches Reagenz umfassend ein inerter Partikel, ein

Protein, ein Immunoglobulin bzw. in Antikörper, ein Diabody, mit den entsprechenden anti-Ha₁, anti-Ha₂ bzw. anti-Ha_n Spezifitäten, Ha₂ eine von Ha₁ verschiedene, definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop, 5 Ha_n eine beliebige andere von Ha₁ und Ha₂ verschiedene definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinante, umfassend ein Hapten, eine spezifische koppelbare antigene Struktur, ein Epitop, ein Paratop, ein Idiotop, 10 Z ein mit mindestens einer Determinante Ha₂ bzw. Ha_n ausgestattetes bzw. verbundenes biologisch, chemisch oder physikalisch wirksames oder detektierbares koppelbares Mittel, umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive 15 Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein 20 Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand, bedeuten.

3. Kombinationspräparationen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß X an eine spezifische biologische Bindungsstruktur oder Teilen davon 25 binden kann.
4. Kombinationspräparationen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur eine Zelloberflächenstruktur, ein Antigen, ein Allergen, ein Epitop, ein 30 Rezeptor, eine Adhäsionsmolekülbindungsstelle oder Teile davon oder ein Zuckerrest, ein Toxin, eine Droge umfaßt.
5. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur mit 35 einem Prokaryonten oder einem Eukaryonten assoziiert ist.

6. Kombinationspräparationen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur mit einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organ eines Säugetiers assoziiert ist oder aus einer biologischen Flüssigkeit stammt.
- 5
7. Kombinationspräparationen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen ein Zelloberflächenantigen ist.
8. Kombinationspräparationen nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zelloberflächenantigen ein Histokompatibilitätsantigen, ein Zellrezeptorantigen, ein Lymphocytenoberflächenantigen, ein Oberflächenantigen von Epithelzellen oder ein Zuckerrest ist.
- 10
9. Kombinationspräparationen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen oder Epitop viralen Ursprungs ist.
- 15
10. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur oder Teile davon von Bakterien, Endo- und Ektoparasiten, Pilzen oder von einer Pflanze abstammt.
- 20
11. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 3 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur natürlichen Ursprungs ist oder über DNA Rekombination, synthetisch oder semisynthetisch hergestellt worden ist oder aus einer nicht-biologischen Flüssigkeit stammt
- 25
12. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 3 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur assoziiert ist mit einem Toxin, welches produziert wird von einem Virus, einer Zelle oder einem Organismus gemäß Ansprüchen 9 und 10.
- 30
13. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur ein mit einem pathologischen Zustand oder ein mit einem nicht-pathologischen
- 35

Zustand einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organ eines Säugetierorganismus assoziiertes Antigen oder Epitop ist.

- 5 14. Kombinationspräparationen nach einem der Ansprüche 3 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur in Gewebeextrakten enthalten ist und in Gewebe- und Zellkulturen vorkommt.
- 10 15. Kombinationspräparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur ein Tumorantigen ist.
- 15 16. Kombinationspräparationen nach einem der Ansprüche 2 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur ein Allergen ist.
- 20 17. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die spezifische biologische Bindungsstruktur assoziiert ist mit einer Droge, einem Medikament oder einem Metabolit davon oder einem chemisch hergestellten Toxin.
18. Kombinationspräparationen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen ein *a priori* lösliches Antigen ist.
- 25 19. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Komponente X ein monoklonaler Antikörper, ein Derivat oder ein Fragment davon ist.
- 30 20. Kombinationspräparationen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß X ein Adhäsionsmolekül ist ausgewählt ist aus der Gruppe LFA, Mac, ICAM.
- 35 21. Kombinationspräparationen nach Ansprüchen 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die an X und Z gebundenen Haptene univalente oder bivalente Haptene sind.

100

22. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Hapten niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht von kleiner 1000 Dalton sind.
- 5 23. Kombinationspräparationen nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Haptene ausgewählt sind aus der Gruppe 2-Nitrophenyl, Nitrophenylphosphat, Digitoxigenin, Digoxigenin, Cholinchlorid, Aminophenylphosphochloride, Glycerophosphocholin, Nitrophenylacetat, Trinitrophenyl, Trinitrophenylglycin, Dimethylsulfoxid,
- 10 Guanidinhydrochlorid, 4-Hydroxy-3-nitrophenylacetat, 2,4-Dinitrophenyl, Benzyl-EDTA.
24. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß Y ein inertes Partikel ist, welches synthetischer,
- 15 organischer oder anorganischer Herkunft ist und an dem ein Antikörper, ein Derivat oder Fragmente davon gebunden sind.
25. Kombinationspräparationen nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß der inerte Partikel aus Polystyrol besteht.
- 20 26. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß Y ein mindestens bispezifischer monoklonaler Antikörper ist, mit der Eigenschaft, mit mindestens zwei verschiedenen definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinanten, welche
- 25 an unterschiedliche Reagenzien, Moleküle oder Substanzen gebunden sind, spezifisch zu reagieren.
27. Kombinationspräparationen gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens bispezifische Antikörper über Fusion
- 30 von Hybridomazellen, über DNA Rekombination erhalten wurde oder ein durch Verbindungsmoleküle zusammengesetztes Heterokonjugat, bestehend aus mindestens zwei distinkten Antikörpern oder Fragmenten davon, ist.
- 35 28. Kombinationspräparationen gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Heterokonjugat über -S—S- Bindungen oder über

101

homobifunktionelle oder heterobifunktionelle Verbindungsmoleküle zusammengesetzt ist.

- 5 29. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das radioaktive Mittel Z ein β - oder γ -Emitter ist.
- 10 30. Kombinationspräparationen gemäß Ansprüchen 29, dadurch gekennzeichnet, daß der β - oder γ -Emitter ausgewählt ist aus ^{125}I , ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{203}Pb , ^{201}Tl , ^{198}Hg , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{60}Co , ^{67}Ga , ^{75}Se , $^{112\text{m}}\text{Ag}$, ^{198}Au , ^{203}Hg , ^{32}P , ^{51}Cr , ^{59}Fe .
- 15 31. Kombinationspräparationen nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß Z als Effektormolekül oder als cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel, eine biologisch aktive Substanz ist ausgewählt aus der Gruppe der Hormone, Enzyme, Cytokine, T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Adhäsionsmoleküle, Wirkstoffvorstufen (prodrugs), Triggermoleküle.
- 20 32. Kombinationspräparationen nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktive Substanz ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel ist und zusätzlich besteht aus einem gegen ein weiteres, unterschiedliches Lymphozytenoberflächenantigen gerichteten Antikörper.
- 25 33. Verwendung eines Kombinationspräparates nach Ansprüchen 1 bis 32 für die therapeutische und prophylaktische Behandlung, für immundiagnostische und prognostische Zwecke, zur Bestimmung eines Krankheitszustandes bei einem Säugetier *in vitro* und *in vivo* und für die Immunisierung eines Säugetiers.
- 30 34. Verwendung eines Kombinationspräparates nach Anspruch 33 für ein Imaging.
- 35 35. Verwendung eines Kombinationspräparates nach Ansprüchen 33 und 34 bei malignen Tumoren, Infektions- und Entzündungserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, zur Immunsuppression, zur Verhinderung einer

102

Abstoßungsreaktion, zur Verhinderung einer Exazerbation eines Krankheitszustandes, bei Erkrankungen des Blutgerinnungssystems oder bei Erkrankungen, die mit einer Defizienz von Adhäsionsmolekülen einhergehen.

- 5
36. Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es aus den Komponenten gemäß Ansprüchen 1 bis 32 besteht.
- 10
37. Mittel bestehend aus Komponente 2 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 32.
- 15
38. Immunolinker, bestehend aus einem mindestens bispezifischen Reagenz Y gemäß der Definition nach Ansprüchen 2, 26 bis 28 mit Bindungsspezifitäten für mindestens zwei verschiedene definierte spezifische, immunologisch reaktive Determinanten gemäß Ansprüchen 2, 21 bis 23.
- 20
39. Verwendung eines Immunolinkers gemäß Anspruch 37 *in vivo* und *in vitro* zum Verbinden von mindestens zwei mit mindestens zwei verschiedenen definierten spezifischen, immunologisch reaktiven Determinanten gemäß Ansprüchen 21 bis 23 ausgestatteten Reagenzien und biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen oder detektierbaren koppelbaren Mitteln.
- 25
40. Verwendung eines Immunolinkers nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß der Immunolinker ein mindestens bispezifischer Antikörper ist.
- 30
41. Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand, ein b i der *in vitro* und *in vivo*
- 35

103

Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkung *in vitro* oder *in vivo* entfaltet oder zeigt, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) eine erste Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Ansprüchen 1 bis 32 mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,

b) eine mindestens zweite Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Ansprüchen 1 bis 32 mit einem von a) unterschiedlichen zweiten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,

c) die nach a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen nacheinander oder gleichzeitig in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System, welches gleich oder verschieden sein kann, in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers,

d) den Schritt gemäß c) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist,

e) die nach Schritt c) oder d) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und

f) die nach e) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

42. Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mittel mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften umfassend ein Effektormolekül, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Immunglobulin bzw. Antikörper, eine Markersubstanz, ein Enzym, eine radioaktive Substanz, eine radioaktiv markierte Substanz, ein Kontrastmittel, eine biologisch aktive Substanz, ein cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkendes Mittel oder ein beliebiges Antigen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, eine Wirkstoffvorstufe (prodrug), ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Lymphokin, ein Chemokin, ein Ligand, eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete

104

biologische, chemische oder physikalische Wirkung *in vitro* oder *in vivo* entfaltet oder zeigt, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) eine Kombinationspräparation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 bestehend aus Komponente 1 und Komponente 2 herstellt,

b) die nach a) bereitgestellte Kombinationspräparation in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers,

c) eine erste Komponente 3 gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 29 bis 32 mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,

d) die nach c) bereitgestellte Komponente 3 dem System nach b) hinzufügt,

e) daran anschließend eine zweite oder weitere Komponente 3 gemäß einem der Ansprüche 1, 2 29 bis 32 mit einem zu bestimmenden Mittel Z mit von c) und untereinander unterschiedlichen biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften dem System gemäß b) gleichzeitig oder nacheinander hinzugibt,

f) gegebenenfalls die Schritte a) bis e) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist,

g) die nach Schritt e) oder f) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und

h) die nach g) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

43. Verfahren zum Screenen einer Pluralität von Mitteln mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausgewählt aus Effektormolekülen, ein Rezeptorbindungsmolekülen, Immunglobulinen bzw. Antikörpern, Markersubstanzen, Enzymen, radioaktiven Substanzen, radioaktiv markierten Substanzen, Kontrastmitteln, biologisch aktiven Substanzen, cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkenden Mitteln oder beliebige Antigenen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, Wirkstoffvorstufen (prodrugs), Adhäsionsmolekülen,

Cytokinen, Lymphokinen, Chemokinen, Liganden, die eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen *in vitro* oder *in vivo* entfalten oder zeigen sollen, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) eine erste Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Ansprüchen 1 bis 32 mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,

b) eine mindestens zweite Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 gemäß Ansprüchen 1 bis 32 mit einem von a) unterschiedlichen zweiten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,

c) die nach a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen nacheinander oder gleichzeitig in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System, welches gleich oder verschieden sein kann, in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers,

d) den Schritt gemäß c) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist,

e) die nach Schritt c) oder d) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und

f) die nach e) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

44. Verfahren zum Screenen einer Pluralität von Mitteln mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften ausgewählt aus Effektormolekülen, ein Rezeptorbindungsmolekülen, Immunglobulinen bzw. Antikörpern, Markersubstanzen, Enzymen, radioaktiven Substanzen, radioaktiv markierten Substanzen, Kontrastmitteln, biologisch aktiven Substanzen, cytotoxisch, cytocidal, cytostatisch oder cytolytisch wirkenden Mitteln oder beliebige Antigenen mit Effektor- Marker- oder Reporterfunktion, Wirkstoffvorstufen (prodrugs), Adhäsionsmolekülen,

106

Cytokinen, Lymphokinen, Chemokinen, Liganden, die eine bei der *in vitro* und *in vivo* Diagnostik, bei der Immuntherapie oder bei Immunisierungen geeignete biologische, chemische oder physikalische Wirkungen *in vitro* oder *in vivo* entfalten oder zeigen sollen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) eine Kombinationspräparation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 bestehend aus Komponente 1 und Komponente 2 herstellt,
- b) die nach a) bereitgestellte Kombinationspräparation in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* System in Kontakt bringt mit einer zu untersuchenden, spezifischen biologischen Bindungsstruktur bzw. einer zu untersuchenden Probe innerhalb oder außerhalb eines tierischen oder menschlichen Körpers,
- c) eine erste Komponente 3 gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 29 bis 32 mit einem ersten zu bestimmenden Mittel Z mit biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften herstellt,
- d) die nach c) bereitgestellte Komponente 3 dem System nach b) hinzufügt,
- e) daran anschließend eine zweite oder weitere Komponente 3 gemäß einem der Ansprüche 1, 2 29 bis 32 mit einem zu bestimmenden Mittel Z mit von c) und untereinander unterschiedlichen biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften dem System gemäß b) gleichzeitig oder nacheinander hinzugibt,
- f) gegebenenfalls die Schritte a) bis e) beliebig wiederholt, wobei das zu bestimmende Mittel Z an Komponente 3 bei jeder Wiederholung hinsichtlich seiner biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften verschieden ist,
- g) die nach Schritt e) oder f) eingetretenen biologischen, chemischen oder physikalischen Wirkungen mißt, detektiert oder aufzeichnet und
- h) die nach g) erhaltenen Ergebnisse einzeln oder miteinander vergleichend auswertet.

45. Verfahren zur Herstellung eines in der *in vitro* und *in vivo* Immundiagnostik verwendbaren Mittels, gekennzeichnet durch die Schritte
- a) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 nach einem der Ansprüche 1 bis 32, oder

10}

b) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und 2 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28,

c) Identifizieren eines hinsichtlich seiner immundiagnostischen Eigenschaft biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen Mittels mittels der in a)

und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen über die Verfahren gemäß Ansprüchen 41 bis 44,

d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels in Form einer Kombinationspräparation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 32 mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder

d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels durch Verbinden mit einem monospezifische Ragenz, welches an biologische Bindungsstrukturen zu binden vermag, nach bekannten Methoden und mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder

e) Formulieren des aus c) erhaltenen Mittels für sich allein nach bekannten Methoden mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen.

46. Verwendung eines Mittels bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß einer der Ansprüche 1 bis 32 oder bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1 und 2 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 oder bestehend aus Komponente 2 gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 26 bis 28 und 38 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 45.

47. Verfahren zur Herstellung einer für die Immunprophylaxe, Immuntherapie und für die Immunisierung verwendbaren pharmazeutischen Zubereitung, gekennzeichnet durch die Schritte

a) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1, 2 und 3 nach einem der Ansprüche 1 bis 32, oder

b) Bereitstellen mindestens einer Kombinationspräparation bestehend aus Komponente 1 und 2 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28,

c) Identifizieren eines hinsichtlich seiner immunprophylaktischen oder immuntherapeutischen Eigenschaften oder seiner Immunisierungseigenschaften biologisch, chemisch oder physikalisch wirksamen Mittels mittels der in a) und b) bereitgestellten Kombinationspräparationen über die Verfahren gemäß Ansprüchen 41 bis 44,

d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels in Form einer Kombinationspräparation gemäß einem der Ansprüche 1 bis 32 mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder

d) Formulierung des aus c) erhaltenen Mittels durch Verbinden mit einem monospezifische Reagenz, welches an biologische Bindungsstrukturen zu binden vermag, nach bekannten Methoden, gegebenenfalls mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen, oder

e) Formulieren des aus c) erhaltenen Mittels für sich allein nach bekannten Methoden, gegebenenfalls mit den bekannten Hilfs- und Trägerstoffen.

48. Verfahren nach Ansprüchen 46 und 47, dadurch gekennzeichnet, daß das monospezifische Reagenz ein Protein, ein Immunglobulin bzw. ein Antikörper oder ein Derivat oder Fragment davon, ein Ligand, ein Lectin, ein Rezeptorbindungsmolekül, ein Adhäsionsmolekül, ein Cytokin, ein Chemokin, ein Lymphokin, ist und daß die biologische Bindungsstruktur definiert ist gemäß Ansprüchen 4 bis 18

49. Verwendung eines Mittels bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß einer der Ansprüche 1 bis 32 oder bestehend aus einer Kombinationspräparation umfassend die Komponenten 1 und 2 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 oder bestehend aus Komponente 2 gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 26 bis 28 und 38 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 47 und 48.

50. Kit zur Durchführung der Verfahren nach einem der Ansprüche 41 bis 48 enthaltend

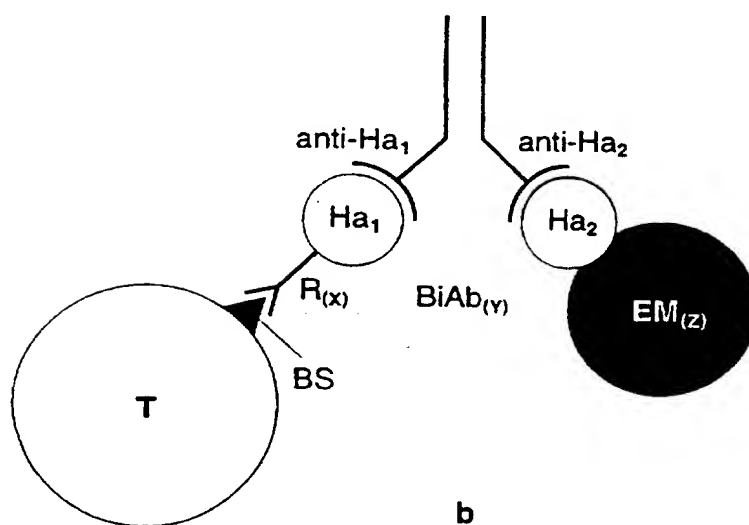
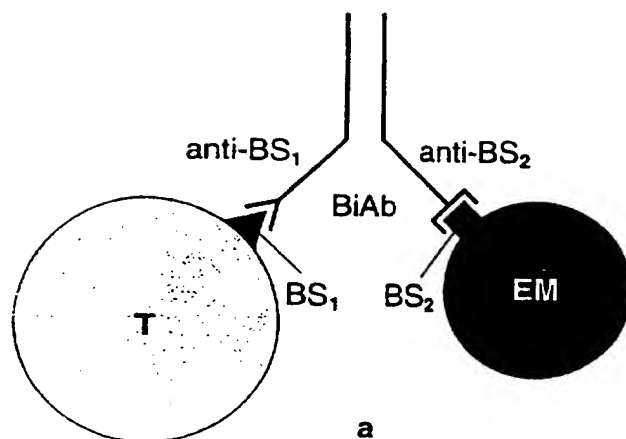
a) die Komponenten 1, 2 und 3 gemäß Ansprüchen 1 bis 32 oder

b) die Komponenten 1 und 2 gemäß Ansprüchen 1 bis 28 oder

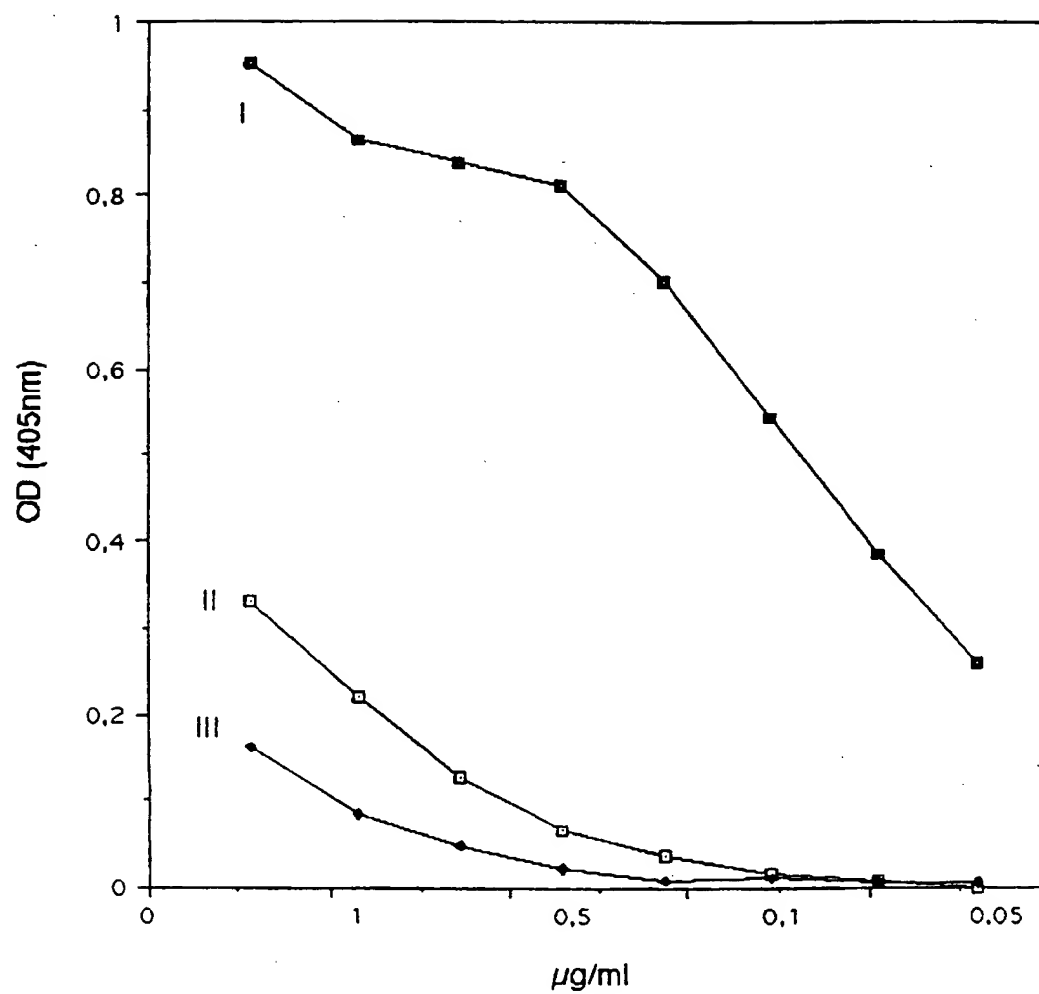
c) die Komponente 2 gemäß Ansprüchen 1, 26 bis 28, 38 oder

d) Komponenten 1, 2 und 3 oder 1 und 2 oder 2 zusammen mit mindestens einer weiteren voneinander unterschiedlichen Komponente 3, gegebenenfalls zusammen mit Hilfs- und Trägerstoffen.

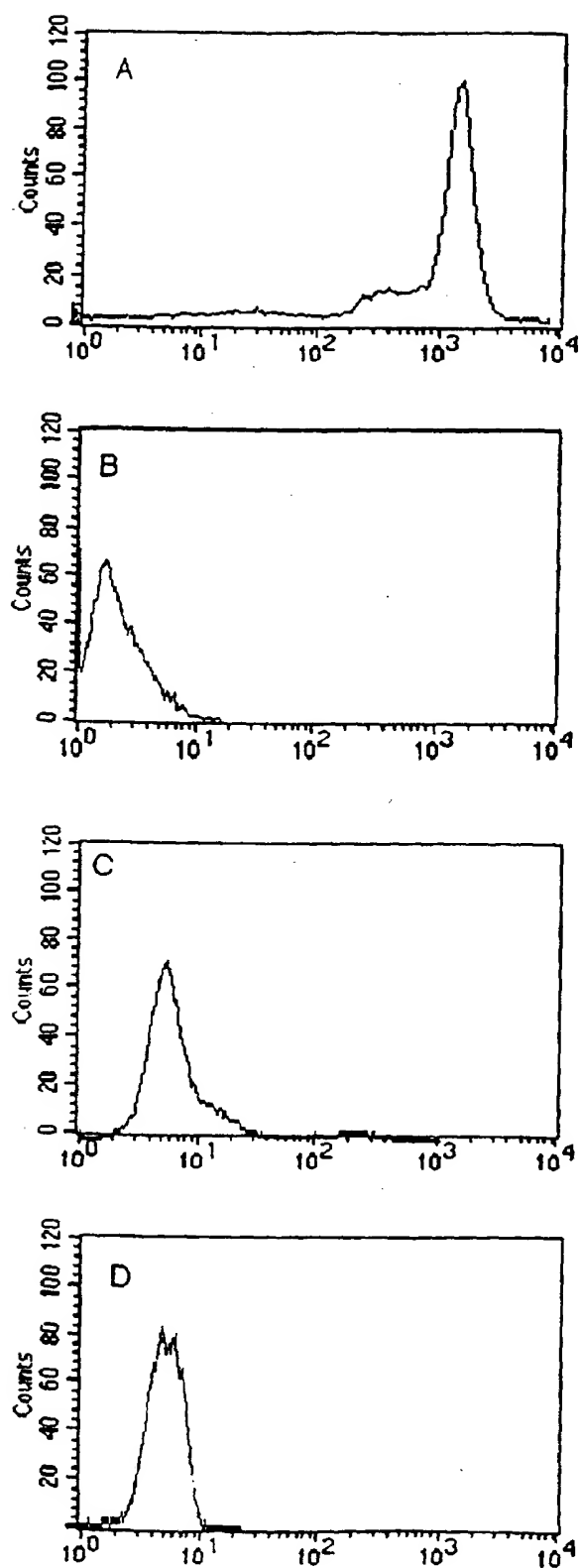
1/3

*Fig 1*

2/3

*Fig 2*

3/3

**Fig 3**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/46 A61K39/395 G01N33/543 C07K16/44 A61K51/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOHLEN, H. ET AL: "CD3XAnti-hapten bispecific antibodies and diabodies: a new universal tool for T-cell retargeting" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, vol. 23, no. 8, 1995, page 776 XP002047464 see abstract 127 ---	1-50
X	WO 94 15642 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC ;US ARMY (US); GEORGE ANDREW J T (GB); S) 21 July 1994 see page 5, line 24 - page 7, line 5 see page 23, line 27 - page 27, line 30 see figures 1,13 see claims 1-40 --- -/-	1-50

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 1997

Date of mailing of the international search report

19.12.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fernandez y Branas, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern nal Application No
PCT/EP 97/04493

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 19, 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 258508, SATOSHI F. ET AL: "Bispecific antibody for antigen determination" page 1047; column 2; XP002047466 see abstract & JP 0829419, 2-02-1996	38
X	--- EP 0 217 577 A (HYBRITECH INC) 8 April 1987 see the whole document	38
X	--- WO 92 20746 A (HYBRITECH INC) 26 November 1992 see the whole document	38
X	--- WO 95 08577 A (MEDICAL RES COUNCIL ;WINTER GREGORY PAUL (GB); HOLLIGER KASPAR PHI) 30 March 1995 see the whole document	38
X	--- PAULUS H. : "Preparation and biomedical application of bispecific antibodies" BEHRING INSTITUTE MITTEILUNGEN, vol. 78, 1985, pages 118-132, XP002028195 see the whole document -----	38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04493

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
See Supplemental Sheet Additional Matter PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/EP 97/04493

Remark: Although claims 33, 35, 39-40 refer to treatment to be applied to human/animal bodies, the search was made based on the indicated effects of the compound.

Remark: Although claim 34 refers to a diagnostic process to be applied to human/animal bodies, the search was made based on the indicated effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9415642 A	21-07-94	AT 159429 T AU 673581 B AU 6084694 A CA 2153568 A DE 69406423 D EP 0679093 A JP 8505623 T	15-11-97 14-11-96 15-08-94 21-07-94 27-11-97 02-11-95 18-06-96
EP 0217577 A	08-04-87	AU 629903 B AU 4975090 A AU 597903 B AU 6264686 A CA 1282069 A DE 3685625 A JP 62070377 A	15-10-92 29-11-90 14-06-90 19-03-87 26-03-91 16-07-92 31-03-87
WO 9220746 A	26-11-92	AU 1929292 A	30-12-92
WO 9508577 A	30-03-95	AU 5654894 A AU 680685 B AU 7621494 A CA 2150262 A CA 2169620 A EP 0672142 A EP 0720624 A WO 9413804 A JP 9503759 T JP 8504100 T AU 1117095 A AU 674568 B AU 6038094 A CA 2155335 A CA 2177367 A WO 9418227 A EP 0686162 A EP 0731842 A FI 953705 A WO 9515388 A JP 8506243 T NO 952989 A	04-07-94 07-08-97 10-04-95 23-06-94 30-03-95 20-09-95 10-07-96 23-06-94 15-04-97 07-05-96 19-06-95 02-01-97 29-08-94 18-08-94 08-06-95 18-08-94 13-12-95 18-09-96 03-08-95 08-06-95 09-07-96 03-10-95

Information on patent family members

PCT/EP 97/04493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter.inales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04493

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K16/46 A61K39/395 G01N33/543 C07K16/44 A61K51/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BOHLEN, H. ET AL: "CD3XAnti-hapten bispecific antibodies and diabodies: a new universal tool for T-cell retargeting" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, Bd. 23, Nr. 8, 1995, Seite 776 XP002047464 see abstract 127	1-50
X	WO 94 15642 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC ;US ARMY (US); GEORGE ANDREW J T (GB); S) 21.Juli 1994 siehe Seite 5, Zeile 24 - Seite 7, Zeile 5 siehe Seite 23, Zeile 27 - Seite 27, Zeile 30 siehe Abbildungen 1,13 siehe Ansprüche 1-40	1-50

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Dezember 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19. 12. 97

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fernandez y Branas, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04493

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 124, no. 19, 1996 Columbus, Ohio, US; abstract no. 258508, SATOSHI F. ET AL: "Bispecific antibody for antigen determination" Seite 1047; Spalte 2; XP002047466 siehe Zusammenfassung & JP 0829419, 2-02-1996	38
X	--- EP 0 217 577 A (HYBRITECH INC) 8.April 1987 siehe das ganze Dokument	38
X	--- WO 92 20746 A (HYBRITECH INC) 26.November 1992 siehe das ganze Dokument	38
X	--- WO 95 08577 A (MEDICAL RES COUNCIL ;WINTER GREGORY PAUL (GB); HOLLIGER KASPAR PHI) 30.März 1995 siehe das ganze Dokument	38
X	--- PAULUS H. : "Preparation and biomedical application of bispecific antibodies" BEHRING INSTITUTE MITTEILUNGEN, Bd. 78, 1985, Seiten 118-132, XP002028195 siehe das ganze Dokument -----	38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/04493

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl die Ansprüche 33, 35, 39-40 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Bemerkung : Obwohl der Anspruch 34 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04493

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9415642 A	21-07-94	AT 159429 T	15-11-97
		AU 673581 B	14-11-96
		AU 6084694 A	15-08-94
		CA 2153568 A	21-07-94
		DE 69406423 D	27-11-97
		EP 0679093 A	02-11-95
		JP 8505623 T	18-06-96
EP 0217577 A	08-04-87	AU 629903 B	15-10-92
		AU 4975090 A	29-11-90
		AU 597903 B	14-06-90
		AU 6264686 A	19-03-87
		CA 1282069 A	26-03-91
		DE 3685625 A	16-07-92
		JP 62070377 A	31-03-87
WO 9220746 A	26-11-92	AU 1929292 A	30-12-92
WO 9508577 A	30-03-95	AU 5654894 A	04-07-94
		AU 680685 B	07-08-97
		AU 7621494 A	10-04-95
		CA 2150262 A	23-06-94
		CA 2169620 A	30-03-95
		EP 0672142 A	20-09-95
		EP 0720624 A	10-07-96
		WO 9413804 A	23-06-94
		JP 9503759 T	15-04-97
		JP 8504100 T	07-05-96
		AU 1117095 A	19-06-95
		AU 674568 B	02-01-97
		AU 6038094 A	29-08-94
		CA 2155335 A	18-08-94
		CA 2177367 A	08-06-95
		WO 9418227 A	18-08-94
		EP 0686162 A	13-12-95
		EP 0731842 A	18-09-96
		FI 953705 A	03-08-95
		WO 9515388 A	08-06-95
		JP 8506243 T	09-07-96
		NO 952989 A	03-10-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04493

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9508577 A		NZ 261571 A	24-03-97
